Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 1, 2020, p. 112-123 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v11i1.70081

پژوهش‌های حبوبات ایران
سال(دوره)۱۱ شمارهٔ۱، نیمهٔ اوّل ۱۳۹۹
صفحهٔ ۱۲۳-۱۱۲، نوع مقاله: پژوهشی

کنترل پوسیدگی و پژمردگی فوزاریومی ریشه نخود با عوامل *Fusarium solani* و *Fusarium oxysporum* با استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه

مسعود سهرابی[1]، خسرو چهری[2] و روح‌الله شریفی[3]*

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه؛ masoodsohrabi13677@gmail.com
۲- استادیار قارچ‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه؛ khchehri@gmail.com
۳- استادیار کنترل بیولوژیک، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۲

چکیده

بیماری پوسیدگی و پژمردگی فوزاریومی نخود که به‌ترتیب توسط گونه‌های *Fusarium solani* و *Fusarium oxysporum* ایجاد می‌شود. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های نخود در ایران است. در این پژوهش، امکان افزایش رشد گیاه و کنترل بیماری توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه جداشده از ریزوسفر گیاه نخود مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۰۰جدایه باکتری به‌دست‌آمده بر اساس روش هاله بازدارندگی علیه هر دو بیمارگر، ۱۶جدایه انتخاب شدند. بیشترین هاله بازدارندگی مربوط به جدایهB13 با ۱۱میلی‌متر علیه بیمارگر *F. oxysporum* بود. سه آزمایش شامل افزایش رشد گیاه در عدم حضور بیمارگرها، مهار پژمردگی فوزاریومی و مهار پوسیدگی فوزاریومی توسط جدایه‌های منتخب و در شرایط گلخانه انجام شد. در عدم حضور بیمارگرها، جدایهB2 وزن‌خشک اندام‌های هوایی را از ۱/۰۸ به ۳/۶۹ افزایش داد و جدایه‌های B3 و B4 بهترین جدایه‌ها در بهبود رشد ریشه بودند. در آزمایش دوم، جدایه‌هایB2 و B13 بیماری پژمردگی فوزاریومی با عامل *F. oxysporum* را بیش از ۹۳درصد کاهش دادند. جدایهٔB2 در حضور این بیمارگر، میانگین وزن‌خشک اندام هوایی را ۴/۴برابر و میانگین وزن‌خشک ریشه را ۵/۴برابر افزایش داد. در آزمایش سوم، جدایهٔB6 بهترین جدایه علیه بیمارگر *F. solani* بود و شاخص بیماری را بیش از ۷۳درصد کاهش داد. این جدایه در حضور این بیمارگر، وزن‌خشک اندام‌های هوایی را ۳/۲برابر و وزن‌خشک ریشه را ۲/۹برابر افزایش داد. شناسایی مولکولی به روش 16S rDNA نشان داد که جدایه‌های B2، B3، B6 و B13 به‌ترتیب متعلق به *Bacilus* sp.، *Achromobacter sp.*، *Bacillus pumilus* و *Bulkholderia* sp. بودند. در مجموع استفاده از باکتری‌های ریزوسفری می‌تواند رهیافتی امیدبخش در مدیریت بیماری‌های فوزاریومی نخود باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد گیاه، کشاورزی پایدار، کنترل بیولوژیک، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani*

مقدمه

گیاه نخود (*Cicer arietinum*) توسط بیمارگرهای متعددی مورد حمله قرار می‌گیرد که بیماری پژمردگی و بوته زردی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris* یا *Fusarium redolens* و پوسیدگی ریشه با عامل *Fusarium solani* از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه می‌باشد (Shanthi &Vittal, 2013, Singh *et al.*, 2013). مبارزه با قارچ فوزاریوم مانند بیشتر قارچ‌های خاکزی آسان نیست. روش های شیمیایی و زراعی برای مبارزه با این بیماری‌ها ارائه شده است که البته با توجه به ماﺋت زیست‌شناسی و بیماری‌زایی این قارچ چندان موفق نبوده‌اند (Naseby *et al.* 2000). لذا در سال‌های اخیر بیشترین توجه به سمت مبارزه تلفیقی این بیماری و استفاده از روش‌های بیولوژیکی معطوف شده است (Nakkeeran *et al.*, 2006). باکتری‌های مفید از طریق آنتی‌بیوز، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، پارازیتیسم، تحریک سیستم دفاعی گیاه، تحریک رشد گیاه و همچنین از طریق رقابت برای جا و غذا باعث مهار بیماری می‌شوند (Nakkeeran *et al.*, 2006, Sharifi & Ryu, 2017). گزارش‌های متعددی از مهار گونه‌های فوزاریوم به‌وسیله باکتری‌های مفید خاک در گیاهان مختلف گزارش شده است. باکتری‌های از جنس ریزوبیوم و سودوموناس قادر بوده‌اند بیماری ناشی از قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* را در باقلا تا ۶۶درصد کنترل کنند (Golpayegani *et al.*, 2011). در مطالعه دیگر باکتری محرک رشد *Rhizobium leguminosarum* قادر بود بیماری پوسیدگی ریشه باقلا با عامل *F. solani* را ۶۰درصد کنترل کند

*نویسنده مسئول: r.sharifi@razi.ac.ir

(Serajzadeh *et al.*, 2013). باکتری‌های محرک رشد از جنس‌های *Rhizobium* و *Pseudomonas* توانستند بیماری را در لرستان تا ۶۶درصد کنترل کنند (Golpayegani *et al.*, 2011). عوامل بیوکنترل قادر به مهار قارچ عامل پژمردگی نیز بوده‌اند. سویه‌های متعلق به گونه *Pseudomonas fluorescens* به‌صورت مؤثری بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی ناشی از قارچ *F. oxysporum* را ۳۳/۰۸درصد مهار کرده‌اند (Manafi Dizaji *et al.*, 2012). در نخود نیز سویه‌ای از *P. fluorescence* توانست بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود با عامل *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* را ۱۰۰درصد کنترل کند (Ebrahimi Kazemabad *et al.*, 2013).

هدف این پژوهش جداسازی و غربال‌گری جدایه‌های باکتری‌های از ریزوسفر گیاه نخود در استان‌های کرمانشاه و کردستان و بررسی اثر آن‌ها علیه دو بیماری پوسیدگی و پژمردگی فوزاریومی نخود در شرایط گلخانه بود. در نهایت جدایه‌های برتر با تعیین توالی ژن DNA ریبوزومی شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های محرک رشد گیاه

نمونه‌برداری از مزارع نخود در استان‌های کرمانشاه و کردستان از اوایل اردیبهشت تا اواخر خردادماه۱۳۹۶ صورت پذیرفت. برای جداکردن باکتری‌های محرک رشد گیاه، از بوته هایی که رشد بیشتری داشتند و در مزرعهٔ دارای بیماری، از بوته‌های کمترآلوده، نمونه‌برداری شد. جهت جداکردن باکتری ها، ریشه‌ها زیر آب شست‌وشو داده شده و سپس با استفاده از هاون چینی ضدعفونی گردیده و آب‌مقطر سترون سوسپانسیونی از ریشه‌های له‌شده و خاک چسبیده به ریشه تهیه گردید. سری رقت تهیه شد و از سوسپانسیون حاصل روی محیط کشتNA (Nutrient Agar) به‌صورت مخطط کشت داده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۷۲ساعت در دمای ۲۷درجه نگهداری شدند و سپس کلنی‌های ایجادشده که از نظر شکل ظاهری متفاوت بودند، جداسازی و خالص گردیدند.

آزمون هالهٔ بازدارندگی

به‌منظور بررسی قدرت بازدارندگی جدایه‌ها از رشد قارچ بیمارگر از روش Hagedorn *et al*, (1989) استفاده شد. هر یک از جدایه‌های باکتری به‌صورت سه‌نقطه‌ای با فاصلهٔ نیم سانتی‌متری از لبهٔ پتری حاوی محیط کشتPDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شدند. پس از ۲۴ساعت یک قرص میسلیومی از کشت جوان قارچ بیمارگر در وسط تشتک پتری قرار گرفت و پتری‌ها تا زمان کامل‌شدن رشد تشتک پتری شاهد در دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

استخراج DNA، تعیین ترادف و شناسایی جدایه‌های منتخب

استخراج DNA باکتری به روش لیز قلیایی انجام شد (Rademaker & de Bruijn, 1997) و ناحیه 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F (5-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3) و 1429 (5-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3) تکثیر شد (Jiang *et al.*, 2006). پس از مشاهده باند مدنظر روی ژل الکتروفورز یک‌درصد، مقدار ۵۰میکرولیتر محصولPCR جهت تعیین توالی قطعه به شرکت Bioneer (Korea) ارسال شد. جدایه‌های قارچ روی محیط‌کشتPDA کشت شدند و به مدت هفت روز در دمای ۲۵درجه سلسیوس نگهداری شدند و DNA جدایه‌ها مطابق روش Möller *et al*, (1992) استخراج شد. تکثیر و توالی ژن Translation Elongation Factor (*TEF-1α*) با استفاده از آغازگرهای EF1 (5’-ATG GGT AAG GAG GAC AAG AC-3’ و EF2 (5’-GGA AGT ACC AGT GAT CAT GTT-3’ انجام شد (O’Donnell *et al.*, 1998). ژن تکثیریافته *TEF-1α* با استفاده از کیت خالص‌سازی (Quiagen)، مطابق دستورالعمل ارائه‌شده توسط شرکت سازنده خالص‌سازی شد. محصول به‌دست‌آمده، به‌منظور تعیین توالیDNA، به شرکت First Base در سنگاپور فرستاده شد. توالی‌های دریافت‌شده از جدایه‌های باکتری و قارچ به‌روش دستی و با استفاده از نرم‌افزار Bioedit ویرایش گردیدند. رشته‌های برآیند با برنامه Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) در Gene bank با توالی‌های موجود در این پایگاه مقایسه گردید.

آزمون گلخانه‌ای

تهیه مایه بیمارگر

گونه‌های بیمارگر از مزارع نخود کرمانشاه جداسازی شده و با استفاده از اطلس (Gerlach & Nirenberg, 1982) شناسایی شدند. اثبات بیماری‌زایی در شرایط گلخانه و روی نخود رقم بیونیج انجام گرفت. برای تهیه مایه قارچ‌های بیمارگر، ورمی‌کولایت طی دو نوبت با فاصله زمانی ۲۴ساعت سترون (دمای ۱۲۱درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰دقیقه) گردید. مقدار ۱۵۰میلی‌لیتر از محیط مایعPDB (Potato Dextrose Broth) به ۲۵۰میلی‌لیتر ورمی‌کولایت سترون اضافه و دوباره اتوکلاو شد. در شرایط سترون قرص‌های میسلیومی قارچ از حاشیه کشت جوان قارچ روی محیطPDA به داخل بطری‌های

حاوی بستر رشد انتقال داده شدند. بطری‌های به مدت سه هفته در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور نگهداری شدند. در فاصله زمانی هفته‌ای یک‌بار بطری‌ها به آرامی تکان داده شدند. به‌منظور رقیق‌کردن مایهٔ بیمارگر، از ورمی‌کولایت با نسبت یک قسمت مایه بیمارگر با ۱۰قسمت از ورمی‌کولایت اتوکلاوشده مخلوط کرده و در آزمایشات گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها و آغشته‌سازی بذور

ابتدا یک لوپ پر از کشت ۴۸ساعته باکتری روی محیط آگار مغذی را به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر محیط مایعNB اضافه کرده و فلاسک‌ها در دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ساعت روی دستگاه شیکر با ۱۵۰دور در دقیقه قرار گرفتند. سلول‌های باکتری با سانتریفوژ به مدت ۷ قیقه در ۶۰۰۰دور در دقیقه رسوب داده شدند. رسوب حاصل با محلول سرم فیزیولوژیک (۸گرم در لیتر سدیم کلرید) حاوی ۵گرم در لیتر متیل‌سلولز به جمعیت $۱×۱۰^{۹}$ رسانده شد.

بذور نخود با هیپوکلریت سدیم یک‌درصد به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی شده و بعد از شستشو با آب‌مقطر، روی کاغذ صافی مرطوب انتقال داده شد و این مجموعه در دمای ۲۷درجه نگهداری گردید. بعد از جوانه‌زنی بذرها به‌مدت ۲۰دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند (Weller & Cook, 1983).

ارزیابی مهار بیماری در شرایط گلخانه

در این آزمایش از گلدان‌های پلاستیکی به قطر دهانهٔ ۸سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰سانتی‌متر (با ظرفیت ۲۵۰گرم خاک سترون) استفاده شد. یک‌سوم از حجم گلدان‌ها با مخلوط سترون‌شده از نسبت ۱:۱:۳ خاک، کود حیوانی و پرلیت پُر شد و به هر گلدان ۴گرم مایهٔ بیمارگر رقیق‌شده اضافه گردید. یک لایه خاک به گلدان‌ها اضافه شد و بذور تلقیح‌شده داخل گلدان قرار گرفتند و روی بذرها یک لایه خاک ریخته شد. آبیاری به‌صورت یک‌روزدرمیان انجام شد. گلدان‌ها تا زمان ظهور نشانه‌های بیماری در گلخانه با ۱۸ساعت روشنایی و دمای ۴±۲۸درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان ۳۰روز، گیاهچه‌ها به‌آرامی از درون گلدان‌ها خارج و صفات مربوط به رشد و بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ارزیابی شدت بیماری از شاخص نمره‌دهی ۰-۴ استفاده شد (Cachinero *et al.*, 2002; Hartman *et al.*, 1997). البته با توجه به خسارت بیمارگر به ریشه و جذب مواد غذایی میزبان، وزن ریشه و اندام‌های هوایی نیز شاخصی از بیماری محسوب می‌شوند. این آزمایش در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نسخه 9.3 نرم‌افزارSAS تجزیه واریانس و با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح پنج‌درصد مقایسه میانگین شدند.

نتایج و بحث

تعداد ۱۰۰جدایه باکتری فراریشه نخود، از مزارع آبی و دیم ۹شهرستان استان کرمانشاه و شِش شهرستان استان کردستان جدا گردید. توانایی جدایه‌ها در مهار رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش هاله بازدارندگی انجام شد. بر اساس نتایج هاله بازدارندگی، ۱۶جدایه علیه هر دو بیمارگر هاله تشکیل دادند. بیشترین هالهٔ بازدارندگی مربوط به جدایهB13 با ۱۱میلی‌متر علیه بیمارگر *F. oxysporum* بود. جدایهB6 بیشترین هاله بازدارندگی را علیه قارچ *F. solani* نشان داد (شکل ۱). از این جدایه‌ها در آزمایش‌های گلخانه به‌منظور مهار دو بیمارگر مذکور در نخود استفاده شد.

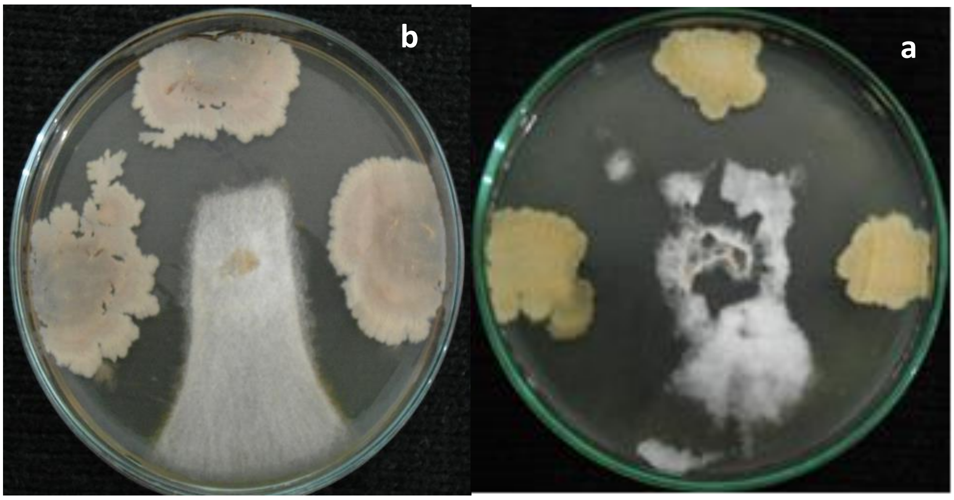
آزمون تأثیر بر افزایش رشد با استفاده از جدایه‌های باکتری بدون حضور بیمارگر

جدول۱، اثر جدایه‌های باکتری روی وزن‌خشک اندام‌های هوایی را نشان می‌دهد. جدایهB2 اختلاف معنی‌داری با جدایه های دیگر داشت و با میانگین وزن‌خشک اندام هوایی ۳/۶۹گرم، بیشترین اثر را نسبت به شاهد سالم با میانگین وزن‌خشک اندام هوایی ۱/۰۸گرم نشان داد. پس از آن باکتری‌های N1 و B3 در یک گروه آماری قرار گرفتند و وزن‌خشک اندام هوایی را نسبت به شاهد سالم به‌ترتیب ۱/۱۲ و ۱/۰۱گرم افزایش دادند. باکتری های B6 و B10 پس از شاهد ضعیف‌ترین تیمارهای این آزمایش بودند و میانگین وزن‌خشک اندام هوایی آن‌ها به‌ترتیب ۱/۳۳ و۱/۲۳گرم بود. در مجموع همهٔ جدایه‌ها باعث افزایش معنی‌دار وزن‌خشک اندام هوایی نسبت به شاهد سالم شدند. بیشترین وزن‌خشک ریشه به مقدار ۱/۴۲ و ۱/۳۶ به‌ترتیب در جدایه‌های B3 و B4 مشاهده شد و کمترین وزن‌خشک ریشه مربوط به شاهد سالم با میانگین ۰/۵۲گرم بود. ضعیف‌ترین جدایه باکتریN1 بود که با میانگین وزن‌خشک ریشه ۰/۶۶گرم کمترین تأثیر را روی این صفت نشان داد. این جدایه جزو جدایه‌های مطلوب در بهبود رشد اندام‌های هوایی بود.

آزمون کنترل زیستی با استفاده از جدایه‌های باکتری با حضور بیمارگر *F. oxysporum*

شکل۲، اثر جدایه‌های باکتری را روی شاخص بیماری *F. oxysporum* نشان می‌دهد. جدایه‌های B13 و B2، بهترین جدایه‌ها در کاهش شاخص بیماری بودند. این جدایه‌ها بیماری را بیش از ۹۳درصد کنترل کردند و اختلاف آماری نیز با هم

نداشتند. جدایه‌های B6، B10 و B4 کمترین اثر را در کاهش شاخص بیماری داشتند، ولی با وجود این، این جدایه‌ها نسبت به شاهد قادر بودند کاهش قابل توجهی در شاخص بیماری داشته باشند. جدایۀ B6 به‌عنوان ضعیف‌ترین جدایه قادر بود بیماری را ۴۰درصد کاهش دهد.



شکل ۱. تأثیر بازدارندگی جدایه‌های باکتری از رشد میسلیوم بیمارگر. a) تأثیر جدایۀB13 در تشکیل هاله بازدارندگی علیه قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*؛ b) تأثیر جدایۀB6 درتشکیل هاله بازدارندگی علیه قارچ *Fusarium solani*

Fig. 1. The effect of bacterial isolates in growth inhibition of pathogenic fungi. a) The effect of B13 against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*; b) Inhibition halo of B6 against *Fusarium solani*

جدول ۱- اثر جدایه‌های باکتری بر وزن‌خشک ریشه و اندام‌های هوایی در حضور و عدم حضور بیمارگرهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* و *Fusarium solani* در شرایط گلخانه

Table 1. The effect of bacterial isolates on chickpea shoot and root dry weight in presence or absence of pathogens, *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and *Fusarium solani*, in greenhouse

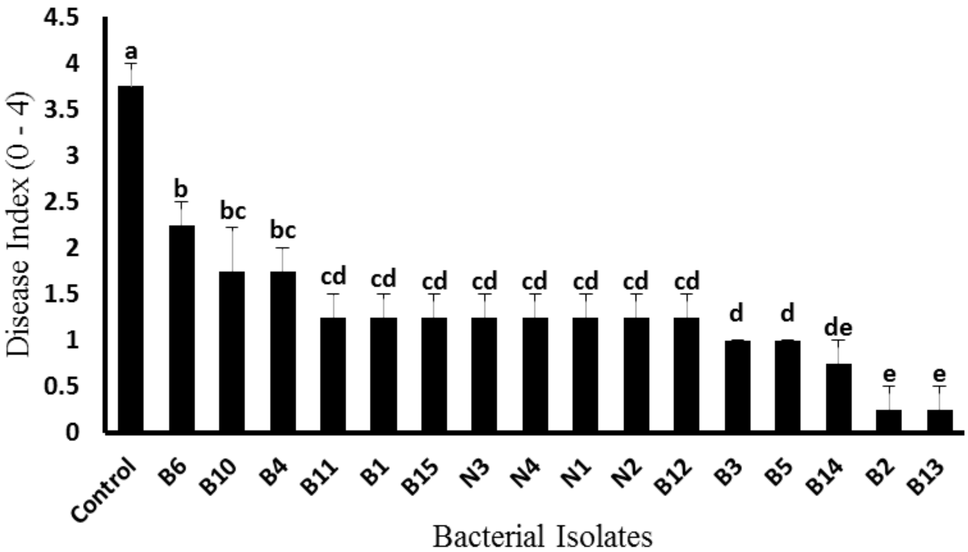
جدایه‌های باکتری Bacteria isolated	وزن‌خشک اندام‌های هوایی و ریشه Shoot and root dry weight (g)					
	شاهد Control		*Fusarium solani*		*Fusarium oxysporum*	
	SDW**	RDW	SDW	RDW	SDW	RDW
B1	1.71 de*	0.89 cd	1.08 f	0.58 g	1.25 ghi	0.71 de
B2	3.69 a	0.91 c	1.87 a	0.86 c	2.49 a	1.31 b
B3	2.09 b	1.42 a	1.45 cd	1.37 a	1.72 cd	1.33 b
B4	1.81 cd	1.36 a	1.38 de	1.09 b	1.61 de	1.49 a
B5	1.75 cde	1.10 b	1.77 ab	1.09 b	1.12 i	1.09 c
B6	1.33 g	0.81 cde	1.47 cd	0.71 de	1.37 fg	0.55 fg
B10	1.23 g	0.80 cde	1.09 f	0.72 d	0.89 j	0.52 g
B11	1.63 ef	0.69 ef	1.39 cde	0.71 de	1.26 ghi	0.53 g
B12	1.86 c	0.77 def	1.40 cde	0.64 defg	1.44 f	0.49 g
B13	1.74 cde	0.79 cde	1.12 f	0.61 efg	1.81 bc	0.75 d
B14	1.75 cde	0.91 c	1.34 e	0.84 c	1.18 hi	0.79 d
B15	1.71 de	1.16 b	1.38 de	0.59 fg	1.81 bc	0.73 de
Control	1.08 h	0.52 g	0.46 h	0.24 h	0.56 k	0.24 h
N1	2.20 b	0.66 f	1.84 ab	0.60 efg	1.89 b	0.52 g
N2	1.70 de	0.81 cde	1.75 b	0.57 g	1.29 gh	0.64 ef
N3	1.69 de	0.71 ef	1.50 c	0.70 def	1.62 d	0.53 g
N4	1.54 f	0.80 cde	0.79 g	0.60 efg	1.47 ef	0.70 de

* مقایسه میانگین با روش حداقل تفاوت معنی‌دار و در سطح احتمال ۵درصد انجام گرفته است و تیمارهای دارای حرف مشابه اختلاف آماری با هم ندارند.

** SDW: وزن‌خشک اندام‌های هوایی؛ RDW: وزن‌خشک ریشه

* Means compression analysis was done by Fisher protected LSD. Means with the same letters do not have significant difference.

** SDW: Shoot Dry Weight, RDW: Root Dry Weight



شکل ۲- تأثیر جدایه‌های باکتری بر شاخص بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* در شرایط گلخانه

ستون‌ها نشانگر میانگین±انحراف معیار بوده و مقایسه میانگین با روش حداقل تفاوت معنی‌دار و در سطح احتمال ۵درصد انجام گرفته است.

تیمارهای دارای حروف مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری با هم ندارند.

Fig. 2. The effect of bacterial isolates on disease index of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* wilt of chickpea in greenhouse

Columns represent mean±standard deviation. Means compression analysis was done by Fisher protected LSD.
Treatments with the same letters do not have significant difference.

جدول۱، اثر جدایه‌های باکتری بر میانگین وزن‌خشک اندام هوایی در حضور بیمارگر *F. oxysporum* را نشان می دهد. جدایه‌های مورد استفاده نه‌تنها بیماری را کاهش دادند، بلکه قادر بودند صفات رشدی گیاه مانند میانگین وزن‌خشک اندام هوایی را به‌صورت قابل‌توجهی بهبود بخشند. جدایه B2 میانگین وزن‌خشک اندام هوایی را از ۰/۵۶گرم شاهد به ۲/۴۹گرم (۴/۴۵ برابر) افزایش داد. جدایه‌های B13، N1 وB15 با میانگین وزن‌خشک ۱/۸۹، ۱/۸۱ و ۱/۸۱ در گروه دوم آماری قرار گرفتند. کمترین اثر در جدایهٔ B10، دیده شد که میانگین وزن‌خشک اندام هوایی را ۵۹درصد افزایش داد. در صفت وزن‌خشک ریشه، جدایه B4، اختلاف آماری با دیگر جدایه‌ها داشت و میانگین وزن‌خشک ریشه را از ۰/۲۴گرم شاهد، به ۱/۴۹گرم (۵/۳۷ برابر) افزایش داد. اختلاف این جدایه با جدایه بعدی (B3)، ۰/۱۶گرم بود. جدایه‌های B11، N3، B12، N1 و B6، کمترین اثر را در افزایش میانگین وزن‌خشک ریشه داشتند، اما با این وجود، این جدایه‌ها قادر بودند نسبت به شاهد آلوده، میانگین وزن‌خشک ریشه را به‌صورت معنی داری افزایش دهند. جدایهٔB12، به‌عنوان ضعیف‌ترین جدایه قادر بود میانگین وزن‌خشک ریشه را از ۰/۲۴گرم، به ۰/۴۹گرم (۱۰۴درصد) افزایش دهد. در مجموع همهٔ جدایه‌ها باعث افزایش معنی‌دار میانگین وزن‌خشک ریشه در حضور بیمارگر شدند. اثر متقابل قارچ *F. oxysporum* و جدایهB2 روی بوته نخود در شکل۳ قابل مشاهده است.

آزمون بیوکنترل با استفاده از جدایه‌های باکتری با حضور بیمارگر *F. solani*

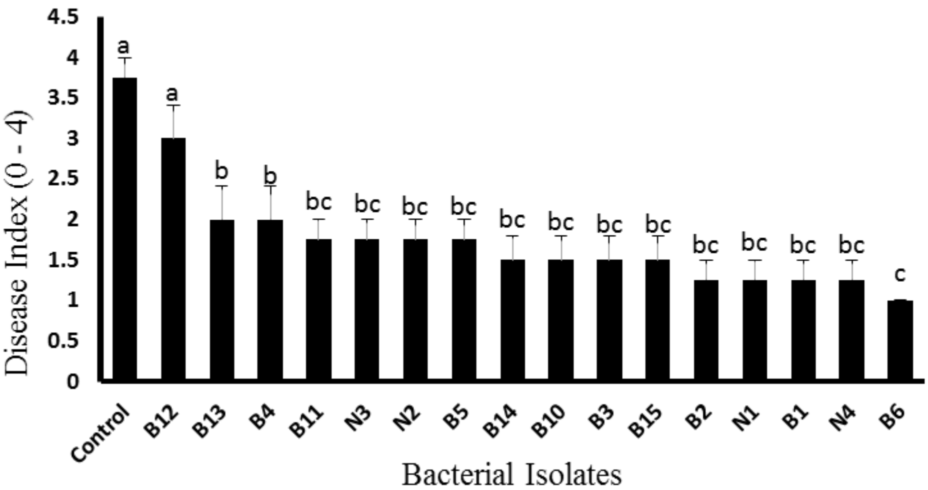
شکل۴، اثر جدایه‌های باکتری را روی شاخص بیماری *F. solani* نشان می‌دهد. جدایهB6، به‌عنوان بهترین جدایه قادر بود شاخص بیماری را از ۳/۷۵ به ۱ برساند و به‌عبارتی شاخص بیماری را بیش از ۷۳درصد کاهش دهد. جدایه‌های B2، N1، B1 و N4 به‌عنوان جدایه‌های بعدی اختلاف معنی داری نشان ندادند و شاخص بیماری را از ۳/۷۵ به ۱/۲۵ رساندند و به‌عبارتی شاخص بیماری را بیش از ۶۶درصد کاهش دادند. جدایه‌های B4 و B13، اختلاف آماری با هم نشان ندادند و شاخص بیماری را بیش از ۴۶درصد کاهش دادند. در مجموع همهٔ جدایه‌ها سبب کاهش شاخص بیماری شدند. کمترین اثر در جدایهٔ B12 دیده شد که شاخص بیماری را نسبت به شاهد آلوده ۲۰درصد کاهش داد.

همان‌طور که جدول۱ قابل مشاهده است، جدایهB2 در حضور بیمارگر *F. solani*، میانگین وزن‌خشک اندام هوایی را از ۰/۴۶گرم شاهد به ۱/۸۷گرم (۳/۸ برابر) افزایش داد.



شکل ۳- اثر تیمار با جدایه باکتری در مهار بیماری پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی نخود؛ ۱) شاهد آلوده به قارچ *Fusrium oxysporum* بدون حضور باکتری، ۲) تأثیر متقابل قارچ *F. oxysporum* و باکتریB2، ۳) شاهد آلوده در حضور قارچ *Fusarium solani* بدون جدایه باکتری، ۴) تأثیر متقابل قارچ *F. solani* و باکتریB6

Fig. 3. The effect of bacterial isolates in suppression of chickpea Fusarium wilt and root rot disease 1) Control infected with *Fusarium oxysporum*, 2) *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* infected and B2 inoculated plant, 3) Control infected with *Fusarium solani,* 4) *F. solani* infected and B6 inoculated plant



شکل ۴- تأثیر جدایه‌های باکتری بر شاخص بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه نخود با عامل *Fusarium solani*. در شرایط گلخانه

ستون‌ها نشانگر میانگین±انحراف معیار بوده و مقایسه میانگین، با روش حداقل تفاوت معنی‌دار و در سطح احتمال ۵درصد انجام گرفته است.

تیمارهای دارای حروف مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری با هم ندارند.

Fig. 4. The effect of bacterial isolates on disease index of *Fusarium solani* root rot of chickpea in greenhouse

Columns represent mean±standard deviation. Means compression analysis was done by Fisher protected LSD.

Treatments with the same letters do not have significant difference.

در جدایه‌های N1 و B5 به‌ترتیب میانگین وزن‌خشک اندام هوایی ۱/۸۴ و ۱/۷۷گرم ثبت شد. در مجموع همۀ جدایه ها سبب افزایش معنی‌دار میانگین وزن‌خشک شدند و کمترین اثر در جدایۀN4 دیده شد که میانگین وزن‌خشک اندام هوایی را ۷۲درصد افزایش داد.جدایۀB3 به‌عنوان بهترین جدایه، میانگین وزن‌خشک ریشه را نسبت به شاهد، از ۰/۲۴گرم، به

۱/۳۷گرم (۵/۷ برابر) افزایش داد. جدایه‌هایB4 و B5 میانگین وزن‌خشک ریشه را ۴/۵برابر فزایش دادند. سویه‌های B1، B15، N4 و N2 کمترین اثر را در افزایش میانگین وزن‌خشک ریشه داشتند، ولی با این حال، این سویه‌ها نسبت به شاهد قادر بودند افزایش قابل‌توجهی در میانگین وزن‌خشک ریشه داشته باشند. اثر متقابل قارچ *F. solani* و جدایهB6 روی بوته نخود در شکل۳ قابل‌مشاهده است.

شناسایی مولکولی باکتری‌های منتخب

بر اساس نتایج، جدایه‌هایB2 و B13 بهترین تیمارها در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی (*F. oxysporum* f.sp. *ciceris*) بودند و جدایهB6 بهترین جدایه در مهار بیماری پوسیدگی فوزاریومی (*F. solani*) ریشه بود. جدایه B2 و B3 نیز بهترین جدایه در بهبود وزن‌خشک گیاه بود. این چهار جدایه که دارای نتایج مناسب بودند جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. ناحیه16S نمونه‌های انتخابی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر گردید. اندازه این قطعه برای باکتری‌ها در حدود ۱۵۰۰جفت باز بود. با مشخص‌شدن صحت اندازه قطعات تکثیرشده با استفاده از آغازگرهای27F (جلوبر) و 1492R (عقب‌بر) روی ژل آگاروز یک‌درصد، نمونه‌ها جهت توالی‌سنجی در جهت رفت ارسال گردیدند.

جدایهB2 با ۹۷درصد شباهت به گونۀ *Bacillus* sp. با شماره دسترسیKM001604 از کشور کره نزدیک بود (Baby *et al.*, 2013). جدایهB3 با ۹۹درصد شباهت به گونۀ *Achromobacter* sp. با شماره دسترسیKU712016 از کشور کره نزدیک بود (You *et al.*, 2017). جدایۀB6 با ۹۸درصد شباهت به گونۀ *B. pumilus* با شماره دسترسیKU501377 از کشور برزیل نزدیک بود (Tangerina *et al.*, 2017). جدایهB13 با ۹۸درصد شباهت به گونۀ *Burkholderia* sp. با شماره دسترسیKU860102 از کشور مصر نزدیک بود (Atef *et al.*, 2016). مقایسه ترتیب توالی ژن*TEF-1α* جدایه‌های بیمارگر در بانک ژنی (GenBank) با ۹۷و ۹۸درصد، بیشترین شباهت را با *F. solani* و *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* نشان داد.

کنترل شیمیایی عوامل بیماریزای خاک‌زاد معمولاً مشکل و گاهی غیرممکن است .لذا جهت مهار این بیماری‌ها روش‌های جایگزین همچون تولید ارقام مقاوم و کنترل بیولوژیک، درحال توسعه است. باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست که در ناحیه ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان وجود دارند، می‌توانند به‌عنوان جایگزینی مناسب و بی‌خطر برای کنترل شیمیایی درنظرگرفته شوند (Sharifi & Ryu, 2017). در این پژوهش، باکتری‌های منتخب قادر بودند در شرایط آزمایشگاه و گلخانه باعث کاهش قابل‌ملاحظۀ شاخص بیماری ناشی از هر دو قارچ بیمارگر شوند. جدایه‌های B13 و B2 شاخص بیماری *F. oxysporum* را به‌صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش دادند. این جدایه‌ها به‌ترتیب متعلق به *Burkholderia* sp. و *Bacillus* sp. هستند. بهترین جدایه در مهار *F. solani* نیز B3 *B. pumilus* بود. جدایۀ *Bacillus* sp. از ناحیۀ ریزوسفر ریشه نخود استان کردستان (سنندج)، روستای سمیران جداسازی شده بود. در منابع موجود، گونه‌های باسیلوس به‌عنوان ریزوباکترهای مؤثر افزایش‌دهندۀ رشد و سلامت گیاه شناخته شده‌اند (Kumar *et al.*, 2011). مکانیسم عمده بیوکنترلی باسیلوس را می‌توان به تولید متابولیت‌های مختلف از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد فرار ضدقارچی و القای مقاومت سیستمیک نسبت داد. آنتی‌بیوتیک هایی مانند سوبتیلین و ایتورین از مهم‌ترین ترکیبات ضدقارچی این باکتری می‌باشند. آنتی‌بیوتیک مایکوسوبتیلین تولیدی توسط برخی از باسیلوس‌ها، باعث بیوکنترل بیماری مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی بوده است (Henis & Inbar, 1968; Leclère *et al.*, 2005; Sharifi & Ryu, 2016a, Szczech & Shoda, 2006). قبلاً ترکیبات فرّار باسیلوس نیز به‌عنوان متابولیت‌های غالب ضدقارچی درنظرگرفته می‌شدند، ولی مطالعات اخیر نشان داده است که این ترکیبات در غلظت-های طبیعی خود بیشتر عامل القای مقاومت هستند تا مهار مستقیم قارچ‌های بیمارگر (Sharifi & Ryu, 2016b). در یک پژوهش، اثر جدایه‌هایی از جنس *B. subtillis*، *P. fluorescens* و قارچ‌کش بنومیل بر بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی با عامل *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* بررسی شد. نتایج نشان داد که جدایۀ *B. subtilis* در خاک آلوده به قارچ نه‌تنها باعث افزایش رشد بوته‌های نخود شدند، بلکه شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی را نیز کاهش دادند (Jamali *et al.*, 2005).

سویه *Burkholderia* sp. با کد شناساییB13 از ناحیه ریزوسفر ریشه نخود استان کردستان، شهرستان دیواندره و روستای شالی‌شل جداسازی شد. این سویه باعث افزایش وزن‌خشک نسبت به شاهد شد. در منابع علمی *B. cepacia* به‌عنوان پروبیوتیکی که رشد گیاهان را افزایش می‌دهد، شناخته شده است (Hayat *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2012). هشت میکروارگانیسم توسط سازمان حفاظت از محیط‌زیست آمریکا ثبت شده که باعث افزایش رشد گیاهان می‌شوند و سویه *B. cepacia* MBI 600 جزو آن‌ها محسوب می‌شود (Kumar, *et al.* 2011). باکتری *B. cepacia* قادر بوده است با تولید پروتئاز، سیانید هیدروژن و سیدرفور از رشد

قارچ *Rhizoctonia solani* روی محیط‌کشت PDA جلوگیری نماید. باکتری *B. cepacia* باعث افزایش درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و وزن تر بوته‌های لوبیا سه هفته پس از کاشت گردیده است (Ahmadzadeh *et al.*, 2009).

جدایه *Achromobacter* sp. با کدشناسایی B3 از ناحیه ریزوسفر نخود و از شهرستان روانسر و روستای کلاه‌کبود جدا شد. این جدایه باعث افزایش قابل‌توجه میانگین وزن‌خشک ریشه شد. محققان سویه *A. xylosoxidans* را مورد استفاده قرار دادند که سبب بیش از ۵۰درصد افزایش رشد در گوجه فرنگی نسبت به شاهد شد (Moretti *et al.*, 2008). محققان (Mayak *et al.*, 2004) در بررسی خود افزایش وزن‌خشک اندام هوایی و ریشه گوجه‌فرنگی تحت شرایط تنش شوری را با استفاده از سویه *Achromobacter* sp. H14G6 مشاهده کردند. در پژوهش حاضر، این سویه باکتری سبب کنترل حدود ۶۵درصد بیماری گردید. به‌دلیل توانایی القای مقاومت توسط این سویه می‌توان مکانیسم بازدارندگی را به القای مقاومت سیستمیک نسبت داد. چنانچه برخی محققان (Bertrand *et al.*, 2000) مکانیسم اصلی مهار بیماری در یک سویه از این جنس را مربوط به القای مقاومت سیستمیک می‌دانند. به کاربردن گونهٔ *A. xylosoxidans* روی نشای گوجه‌فرنگی سبب کنترل ۵۰درصد بیماری *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* نسبت به شاهد شد. سویهٔ *Achromobacter* sp. جداشده از ریشهٔ گوجه‌فرنگی سبب کنترل پژمردگی آوندی با عامل *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* شده است (Moretti *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2009).

نتیجه‌گیری

در مجموع مشاهده شد که جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش، کارآیی متفاوتی در افزایش رشد قسمت‌های مختلف گیاه و در مهار بیمارگرهای متفاوت داشتند. جدایه *Bacillus* sp. بهترین باکتری در بهبود وزن‌خشک اندام‌های هوایی بود. در مقابل جدایه *Achromobacter* sp. B3 توانایی بالایی در افزایش وزن‌خشک ریشه داشت، ولی کارآیی آن در بهبود رشد اندام‌های هوایی متوسط بود. یک متابولیت باکتری می‌تواند اثر دوگانه‌ای در تنظیم رشد داشته باشد. اکسین در مقدار بالا، رشد ریشه را زیاد می‌کند، ولی رشد قسمت‌های هوایی را کاهش می‌دهد (Sharifi & Ryu, 2017). این نقش دوگانه متابولیت‌های باکتری و حساسیت به آن‌ها در مورد قارچ‌های بیمارگر نیز دیده می‌شود (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2009). با توجه به این موارد توصیه می‌شود در امر مهار بیماری‌های فوزاریومی ریشه که معمولاً به‌صورت توأم در مزرعه دیده می‌شوند، از ترکیبی از جدایه‌ها استفاده شود.

منابع

1. Ahmadzadeh, M., Sharifi Tehrani, A., and Nabizadeh, M. 2009. Biological control of *Rhizoctonia Solani* Kuhn casual agent of common bean damping-off through *Burkholderia cpacia* (ex. Burk) Yabucchi. Iranian Journla of Plant Protection Science 39: 81-90.
2. Baby, V., Rajakumar, S., and Ayyasamy, P. 2013. Reduction of ferric iron in synthetic medium amended with acetate as a sole carbon source. International Journl of Current Microbiology 2: 501-513.
3. Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P., and Cleyet-Marel, J. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). Canadian Journal of Microbology 46: 229-236.
4. Cachinero, J., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R., and Tena, M. 2002. Plant defence reactions against fusarium wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonhost isolates of *F. oxysporum*. Plant Pathology 51: 765-776.
5. Ebrahimi Kazemabad, Z., Rohani, H., Jamali, F., and Mahdikhani Moghadam, E. 2013. Antagonistic effect of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. Iranian Journal of Pulses Research 3: 1-10.
6. Gerlach, W., and Nirenberg, H. 1982. The Genus Fusarium-A Pictorial Atlas Berlin-Dahlem.
7. Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Reveiw of Phytopathology. 43: 205-227.
8. Golpayegani, S., Zafari, D., and Khodakaramian, G. 2011. The Biological control of important faba bean root rot agents caused by rhizospheric antagonist bacteria. Iranian Journal of Plant Protection Science 41: 283-292.
9. Hagedorn, C., Gould, W., and Bardinelli, T. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied and Environmental Microbology 55: 2793-2797.

10. Hartman, G., Huang, Y., Nelson, R., and Noel, G. 1997. Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. Plant Disease 81: 515-518.
11. Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., and Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annals of Microbiology 60: 579-598.
12. Henis, Y., and Inbar, M. 1968. Effect of *Bacillus subtilis* on growth and sclerotium formation by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 58: 933-938.
13. Jamali, F., Sharifi Tehrani, A., Okhovat, M., and Zakeri, Z. 2005. Effect of antagonistic bacteria on the control of Fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* under greenhouse conditions Iran Journal of Agricultural Sciences 36: 711-717.
14. Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R., and Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. Applied and Environmental Microbiology 72: 3832-3845.
15. Kang, S.M., Khan, A.L., Hamayun, M., Shinwari, Z.K., Kim, Y.H., Joo, G.J., and Lee, I.J. 2012. *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. Pakistan Journal of Botany 44: 365-372.
16. Kumar, A., Prakash, A., and Johri, B. 2011. Bacillus as PGPR in crop ecosystem. In: Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems. Springer. p. 37-59.
17. Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Applied and Environmental Microbiology 71: 4577-4584.
18. Manafi Dizaji, R., Babay Ahari, A., Arzanlou, M., and Valizadeh, M. 2012. Assessment of resistance in tomato varieties under greenhouse conditions against Fusarium wilt, and biological control of the disease. Journal of Agricultural Science And Sustainable Production 22: 145-158.
19. Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B.R. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry 42: 565-572.
20. Moretti, M., Gilardi, G., Gullino, M., and Garibaldi, A. 2008. Biological control potential of *Achromobacter xylosoxydans* for suppressing Fusarium wilt of tomato. International Journal of Botany 4: 369-375.
21. Nakkeeran, S., Kavitha, K., Chandrasekar, G., Renukadevi, P., and Fernando, W. 2006. Induction of plant defence compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*. Biocontrol Science and Technology16: 403-416.
22. Naseby, D., Pascual, J., and Lynch, J. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. Journal of Applied Microbiology 88: 161-169.
23. Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature Chemical Biology 5: 308-316.
24. Rademaker, J.L., and de Bruijn, F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews 1: 151-171.
25. Serajzadeh, N., Khodakaramian, G., and Soleymani Pari, M.J. 2013. Interaction between root nodulating bacteria and *Fusarium solani* the causal agent of faba-bean root rot. Scientific Journal Management System 2: 1-8.
26. Shanthi, A.T., and Vittal, R.R. 2013. Biocontrol potentials of plant growth promoting rhizobacteria against Fusarium wilt disease of cucurbit. International Journal of Phytopathology 2: 155-161.
27. Sharifi, R., and Ryu, C.M. 2016a. Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? Frontiers in Microbiology 7: DOI: 10.3389/fmicb.2016.00196.
28. Sharifi, R., and Ryu, C.M. 2016b. Making healthier or killing enemies? Bacterial volatile-elicited plant immunity plays major role upon protection of Arabidopsis than the direct pathogen inhibition. Communicative & Integrative Biology. DOI: 10.1080/19420889.2016.1197445.
29. Sharifi, R., DOI Ryu, C.M. 2017. Chatting with a tiny belowground member of the holobiome: communication between plants and growth-promoting Rhizobacteria. Advances in Botanical Research 82: 135-160.
30. Singh, P.K., Singh, M., Agnihotri, V., and Vyas, D. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi: biocontrol against Fusarium wilt of chickpea. International Journal of Scientific Research Publication 3: 1-5.

31. Srinivasan, K., Gilardi, G., Garibaldi, A., and Gullino, M. 2009. Bacterial antagonists from used rockwool soilless substrates suppress Fusarium wilt of tomato. Journal of Plant Pathology 147-154.
32. Szczech, M., and Shoda, M. 2006. The Effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. Journal of Phytopathology 154: 370-377.
33. Tangerina, M.M., Correa, H., Haltli, B., Vilegas, W., and Kerr, R.G. 2017. Bioprospecting from cultivable bacterial communities of marine sediment and invertebrates from the underexplored Ubatuba region of Brazil. Archive of Microbiology 199: 155-169.
34. Weller, D., and Cook, R. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73: 463-469.
35. You, Y.H., Park, J.M., Yi, P.H., Back, C.G., Park, M.J., Han, K.S., Yoon, J.B., Kim, H.H., and Park, J.H. 2017. Microflora of phytopathogen-transferring *Bradysia agrestis*: a step toward finding ideal candidates for paratransgenesis. Symbiosis 71: 35-46.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 11, No. 1, 2020, p. 112-123 (Research Article)

Biological control of chickpea Fusarium wilt and root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* with plant probiotic bacteria

Sohrabi[1], M., Chehri[2], Kh. & Sharifi[3*], R.

1. MSc. of Plant Biology, Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran; masoodsohrabi13677@gmail.com
2. Assistant Professor of Mycology, Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran; khchehri@gmail.com
3. Assistant Professor of Biological Control, Department of Plant Protection, Razi University, Kermanshah

Received: 14 January 2018
Accepted: 24 September 2018

DOI: 10.22067/ijpr.v11i1.70081

Introduction

Wilt and root rot diseases caused by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* are among the most important diseases of chickpea throughout the world and Iran. However, there is not effective chemical fungicide against these soil-borne pathogenic fungi. In recent years, rhizospheric bacteria and fungi developed as promising biofungicides against soil-borne plant pathogens. These microbes exploit several mechanisms such as antibiotics, volatile organic compounds, sidereophore and induced systemic resistance to suppress pathogenic fungi. Recently, the cost of agrochemical innovation and the period of time for their registration have increased rapidly due to stringent legislation, both of these reasons favor investment in the manufacture of biopesticides. The annual progress rate of the biopesticide bazaar is more than 16%, but that of synthetic pesticides has been decreasing by 1.5% annually. Biopesticide companies such as Agroquest, Gustafson, Marrone Bio Innovation, Certis, BioWorks, Becker Underwood, ABiTEP GmbH, and Prophyta have released effective biopesticides to the market. Agrochemical great-companies such as Bayer CropScience have also been engrossed in the bio-pesticide market. Bayer CropScience bought Agroquest in 2012 at a price of 425 million US dollars. Overall, biological control of plant pathogens is promising technology in management of plant disease in sustainable agriculture.

Materials & Methods

In this study, potential of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) were investigated on biological control of this diseases in laboratory and greenhouse condition. Soil samples were collected from chickpea fields in Kermanshah and Kurdestan provinces. The effect of isolated bacteria were assessed on mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. solani* in dual culture test. The chickpea seeds were inoculated by 10^9 CFU/ml of each bacterial isolates and sown in pots. The effect of bacterial isolates have been investigated on plant growth factors in greenhouse situation. The same experiment was conducted to assess the biocontrol ability of selected isolates against Fusarium wilt and root rot disease of chickpea. The greenhouse experiments were conducted based on completely randomized design with four replicates. Data were subjected to analysis of variance procedure in SAS ver. 9.1 software and means compression analysis was done by Fisher protected LSD. Finally, the 16S rDNA of the four selected isolates, B2, B3, B6 and B13 were sequenced and identified based on Genebank data.

Results & Discussion

Sixteen out of 100 isolated inhibited the growth of both fungi *in vitro*. Isolates B13 with 11 mm inhibition zone had the highest growth inhibition activity against *F. oxysporum*. In absence of pathogens, B2 increased aerial part dry weight from 1.08 to 3.69 g in greenhouse condition. B3 and B4 were the best isolates in improving root growth. They increase root dry weight to 1.42 and 1.36 g, respectively. B2 and B13 isolates had the greatest effect on plant health and reduced disease severity up to 90% in *F. oxysporum* inoculated plants. The lowest biocontrol activity against *F. oxysporum* was recorded for isolate B6. B2 increased aerial part fresh weight from 0.56 to 2.49 g, root fresh weight from 0.24 to 1.31 g. B6 was the best isolate for suppression of *F. solani* and reduced the disease index by 73%. This isolate increased aerial

*Corresponding Author: r.sharifi@razi.ac.ir

organs fresh weight as up to 3.2 folds and root fresh weight up to 2.9 folds. However, all of bacteria isolates were able to reduce Fusarium root rot disease, significantly. Isolates B2, B3, B6 and B13 were characterized as *Bacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Bacillus pumilus* and *Burkholderia* sp. based on 16S rDNA sequencing, respectively. *Bacillus* spp. strains exploit several mechanisms such as antibiosis, volatile organic compound production and induced systemic resistance against plant pathogens. These bacteria are good candidate to be formulated in spore suspension form. Here, *Achromobacter* introduced as good candidate for biological control of Fusarium diseases of chickpea for first time. Overall, plant probiotic bacteria could be consider as promising approach in management of chickpea Fusarium diseases.

Conclusion

Bacterial isolates have different ability in plant growth improvement and suppression of plant pathogens. *Bacillus* sp. was the best isolate for enhancing the shoot dry weight while *Achromobacter* sp. was the best to improving root dry weight. Indeed, bacteria have several mechanisms for promoting plant growth. Auxin induction by volatiles of *Bacillus* spp. increase root while decreasing the shoot accumulation of auxin. Overall, consortia of bacteria strains seems to be promising approach to suppression of both diseases in chickpea.

Keywords: Biological Control, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, PGPR, Sustainable Agriculture